

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04204

研究課題名(和文) 世界初の機能亢進型GNAS生殖細胞変異の同定と新規GNAS機能低下発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification of the germline-derived GNAS gain-of-function mutations and clarification of the novel mechanism leading to GNAS loss-of-function

研究代表者

緒方 勤(OGATA, TSUTOMU)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40169173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：GNAS-Gsaは、Gタンパク質共役型受容体の細胞内シグナル伝達を介する分子である。われわれは、常染色体優性の抗利尿不適合性腎症候群を呈する2家系で同定した新規GNAS変異(p.F68_G70delとp.M255V)にたいして、タンパク構造解析、ルシフェラ-ゼ解析、モデルマウスの作出と表現型解析を行い、これらが世界初の機能亢進型生殖細胞変異であることを明らかとした。さらに、常染色体優性の偽性副甲状腺機能低下症を招くA/B-DMRの低メチル化が、GNAS領域における133 kbのGNAS-DMRsを含む複雑な2および3重複やSVA型レトロトランスポゾン挿入で発症することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、第1に世界で初めて生殖細胞由来GNAS-Gsa軽度機能亢進変異の存在を証明し、新規遺伝性疾患を樹立したことにある。さらに、この機能亢進にたいしてAVPR2が最も感受性であること、この変異が体細胞由来高度機能変異で生じるMcCune-Albright症候群を発症しないことも明らかとなった。また、常染色体優性の偽性副甲状腺機能低下症は、STX16欠失を伴うA/B-DMRの低メチル化で生じることが知られていたが、本研究で初めてGNAS領域のゲノム伸張やSVA型レトロトランスポゾン挿入によっても発症することが示された。これらの成果は、GNAS-Gsaの研究を促進させるものである。

研究成果の概要(英文)：GNAS-Gsa mediates signal transductions of multiple G-protein-coupled receptors. It is biallelically expressed in most tissues including the renal collecting duct and is predominantly expressed from the maternal allele in a few tissues such as the renal proximal tubule. We performed whole exome sequencing and identified novel p.F68_G70del and p.M255V variants in two families with dominantly inherited nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD). We further performed protein structural analysis, in vitro functional analysis, and model mouse analysis, successfully demonstrating that both variants have gain-of-functions. This study demonstrates for the first time the presence of germline-derived GOF variants of GNAS-Gsa and establishes a novel Gs-mediated genetic disease. We also identified for the first time that elongation of the GNAS region and insertion of retrotransposon can lead to pseudohypoparathyroidism type 1b.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：GNAS 抗利尿不適合性腎症候群 機能亢進 偽性副甲状腺機能低下症 機能低下

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト第20番染色体長腕に存在する *GNAS* 領域の遺伝子は、複雑な構造や発現様式を示すことが知られている (図1)。このうち、エクソン1-13から成る *GNAS* 遺伝子 (MIM*139320) は、複数のホルモン受容体を含む G タンパク質共役型受容体ファミリーの細胞内シグナル伝達を介する *Gsα* タンパクをコードし (以下 *GNAS-Gsα* と表記する)、多くの組織では両親性発現を示すが、腎近位尿細管などでは *GNAS-DMRs* (メチル化可変領域) の由来親特異的メチル化パターンに依存して母性発現を呈する。すなわち、*GNAS-Gsα* 遺伝子は、母由来アレルでは *NESP55-DMR* の低メチル化、*AS-DMR*、*XLas-DMR*、*A/B-DMR* の高メチル化を伴って発現し、父由来アレルでは逆のメチル化パターンのために発現しない。特に、*A/B-DMR* のメチル化が、母性発現に決定的な役割を果たしている。そして、現在までに、以下のことが判明している。

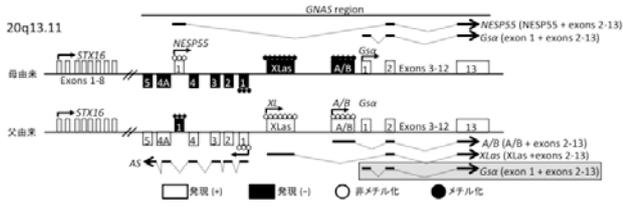


図1. *GNAS* 領域の構造と発現パターン。*Gsα*をコードする *GNAS* 遺伝子は、多くの組織では両親性発現を示すが、腎尿細管などでは *A/B-DMR* の高メチル化状態を有する母由来アレルからのみ発現する (灰色背景で示すように父由来アレルからは発現しない)。

(1) 機能亢進型 *GNAS-Gsα* 体細胞変異は、皮膚カフェオレ斑、線維性骨異形成症、ゴナドトロピン非依存性思春期早発症を3主徴とする McCune-Albright 症候群 (MAS) (MIM #174800) を招く。(2) 通常、母由来アレルにおける機能低下型 *GNAS-Gsα* 生殖細胞変異や欠失は、Albright 遺伝性骨ジストロフィー (AHO) を伴う偽性副甲状腺機能低下症 (PHP-Ia) (MIM #103580) を、*GNAS-DMRs* 全般あるいは *A/B-DMR* 単独のエピ変異ならびに第20番染色体父性ダイソミーは、AHO を欠く PHP-Ib (MIM #603233) を生じる。(3) エピ変異による PHP-Ib は、体細胞分裂過程の異常によると推測される *GNAS-DMRs* 全般のエピ変異を伴う弧発型と、生殖細胞由来の *STX16* あるいは *NESP55* 欠失に起因するとされる *A/B-DMR* 単独のエピ変異を呈する常染色体優性型 (AD-PHP-Ib) に分類される。しかし、機能亢進型 *GNAS* 生殖細胞変異は致死的とされ、現在までに報告されていない。また、詳細なエピ変異発症機序は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) われわれが常染色体優性抗利尿不適合性腎症候群 (NSIAD) を呈する2家系で同定した新規 *GNAS-Gsα* 変異が、世界初の機能亢進型生殖細胞変異であることを示すこと、(2) われわれが常染色体優性の偽性副甲状腺機能低下症を示す2家系で同定した *GNAS-STX16* 領域のゲノム構造異常やレトロトランスポゾン挿入が、*A/B-DMR* 単独のエピ変異を発症する機序を解明することである。これにより、ヒト疾患発症における *GNAS* の多様な役割を明らかにすると共に、新規ヒト遺伝性疾患の確立ならびに新規ヒト疾患発症機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

分子生物学的解析、タンパク構造解析、in vitro 機能解析、モデルマウス解析を行った。

4. 研究成果

(1) 世界初の機能亢進型生殖細胞由来 *GNAS-Gsα* 変異の証明

① 常染色体優性抗利尿不適合性腎症候群 (NSIAD) を呈する2家系

家系図は図2に示すとおりである。罹患者は、高利尿ホルモン (AVP) が極めて低値であるにも関

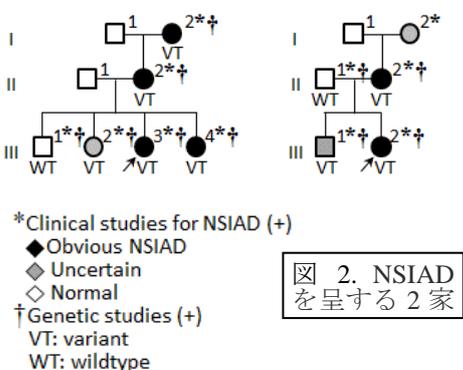


図2. NSIAD を呈する2家系

わらず、低血清浸透圧と高尿浸透圧が診られ、これらは飲水制限で改善し、飲水負荷試験で人からの自由水排泄低下が証明された (図3)。

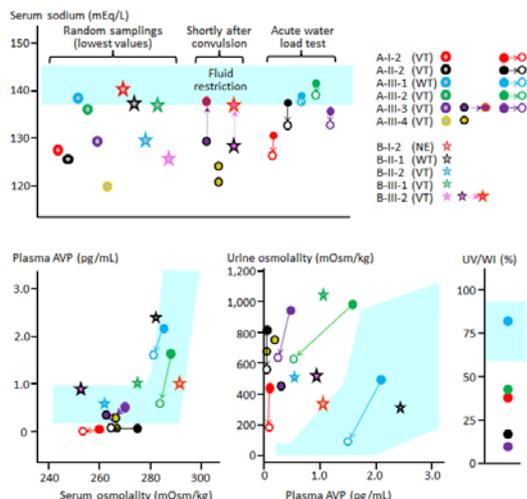


図3. 2家系の臨床データ

②GNAS-Gsα変異の同定

われわれは全エクソーム解析を行い、2つの家系でGNAS-Gsαにp.F68_G70delとp.M255V変異を同定した(図4)。共に一般集団には存在しない稀な変異で、p.M255V変異の病原性は高く、AVP受容体シグナル経路に存在する唯一の変異であった。

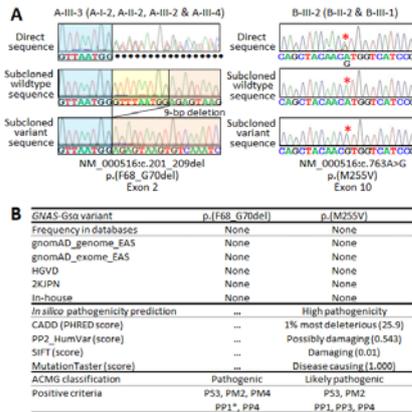


図4. GNAS-Gsα変異

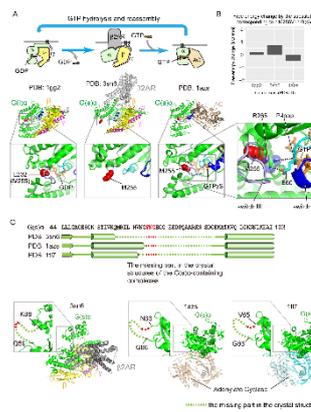


図5. タンパク構造解析

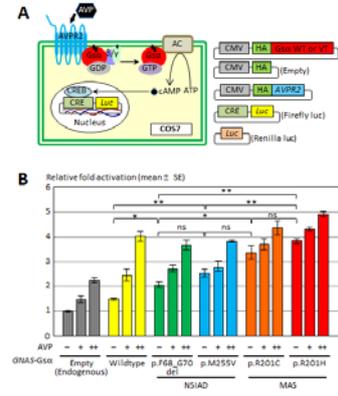


図6. ルシフェラーゼ解析

③変異タンパク構造解析

p.F68_G70delとp.M255Vを有するGNAS-Gsαタンパクは、共に立体構造に変化はなく、p.F68_G70delはフレキシブルな領域に存在するために評価はできなかったが、p.M255Vは、P-loopの不安定性を介してGTPase活性を阻害することで機能亢進を招くことが判明した(図5)。

④in vitro ルシフェラーゼ解析

COS7細胞を用いて行った解析で、p.F68_G70delとp.M255Vが共に機能亢進作用を有すること、その程度は、p.M255Vにおいてp.F68_G70delよりもやや強く、MASを生じるp.R201C/p.R201Hよりも弱いことが示された(図6)。これは、MAS特異的p.R201C/p.R201Hが生殖細胞由来であるときに致死性である一報、NSIADを生じるp.F68_G70delとp.M255Vが致死性ではないこと、また、この軽度機能亢進変異に対する感受性はAVPR2が最も強いことを示すデータである。

⑤モデルマウス解析

p.F68_G70delとp.M255VモデルマウスをCRSPR/Cas9で作出し、表現型を解析した。p.F68_G70delとp.M255Vモデルマウスは、共に胎児期にはメンデル遺伝に一致する頻度で観察されたが、p.F68_G70delが生後も問題なく生存したのに対し、p.M255Vモデルマウスは生後急速に死亡した(表1)。また、p.F68_G70delモデルマウスは、生後一見して正常で、体重も飲水量も正常であった(図7)。

Supplemental Table 5. Numbers of pups and embryos produced by mating between heterozygous female and male mice

WT/Δ × WT/Δ (20 pregnancies)			
Genotype	WT/WT	WT/Δ	Δ/Δ
Number of pups at ~ 24 hours of age			
Total	45	78	39
Female	23	42	17
Male	22	36	22
P = 0.72			
WT/M255V × WT/M255V (15 pregnancies)			
Genotype	WT/WT	WT/M255V	M255V/M255V
Number of pups at ~ 24 hours of age			
Total	44	61	5
Female	17	26	1
Male	27	35	4
P = 0.00000051			
Number of pups at ~ 48 hours of age			
Total	44	59	4
Female	17	26	1
Male	27	33	3
P = 0.00000018			
WT/M255V × WT/M255V (5 pregnancies)			
Genotype	WT/WT	WT/M255V	M255V/M255V
Number of embryos at 18.5 days post coitum			
Total	12	26	11
Female	8	14	5
Male	4	12	6
P = 0.89			

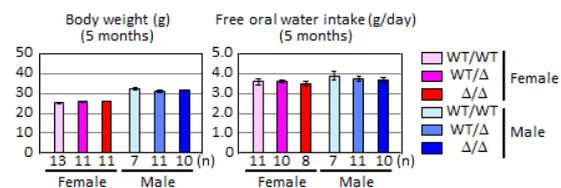


図7. p.F68_G70delモデルマウスの体重と飲水量

そこで、われわれは、p.F68_G70delモデルマウスに対して水負荷試験を行った。その結果、患者と同様、このモデルマウスは、腎臓からの自由水排泄不全を反映して、飲水後においても尿浸透圧やNaなどの比較的高値を呈していた(図8)。

⑥まとめ

以上の結果は世界初の機能亢進型GNAS-Gsα生殖細胞変異の存在を証明し、これが抗利尿不適合性腎症候群(NSIAD)を招くことを示すものである。さらに、機能亢進型GNAS-Gsα生殖細胞変異に起因する新しい遺伝性疾患を樹立すると共に、GNAS-Gsα/G-proteinシグナル伝達機能の解明大きく進展させるものである。

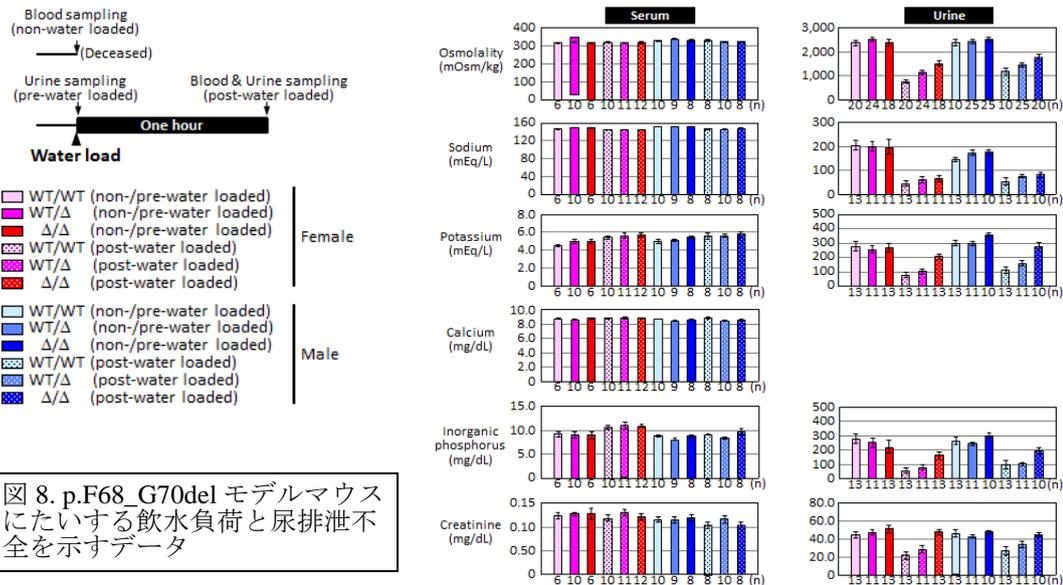


図 8. p.F68_G70del モデルマウスにたいする飲水負荷と尿排泄不全を示すデータ

(2) 新規 PHP-Ib 発症機序の検討

①GNAS 領域の重複に起因する常染色体優性 PHP-Ib 発症

われわれは、*STX16* あるいは *NESP55* 欠失が否定され、しかし、*A/B*-DMR 単独のエピ変異を有する家族性 PHP-Ib 症例を経験した (図 9)。そして、アレイ CGH 解析、メチル化解析、全ゲノム解析により、GNAS 領域の 2-3 重複を見出した (図 10)。

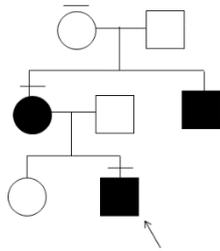


図 9. 家族性 PHP-Ib 症例の家系図

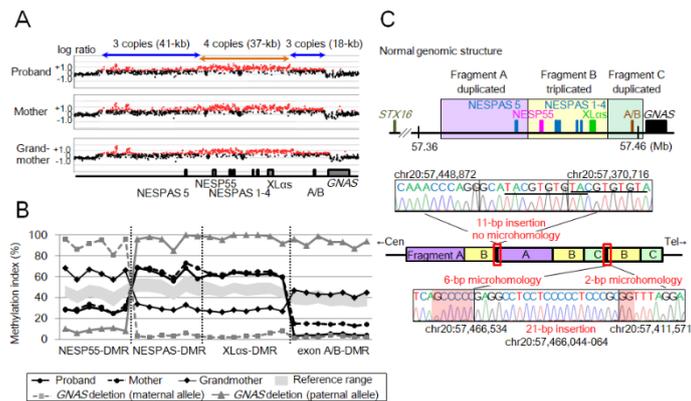


図 10. 同定された複雑な GNAS 領域構造異常

②GNAS 領域への SVA 型レトロトランスポゾン挿入による常染色体優性 PHP-Ib 発症

われわれは、同様に *STX16* あるいは *NESP55* 欠失が否定され、しかし、*A/B*-DMR 単独のエピ変異を有する家族性 PHP-Ib 症例を経験した (図 11)。この家系では、アレイ CGH ではゲノム構造異常は同定されなかったが、全ゲノム解析で GNAS 領域のゲノム構造の不連続性・断裂を示唆する所見が得られた (図 12)。そして、その後のゲノムシーケンスで、1,091 bp の SVA 型レトロトランスポゾン挿入が同定された。

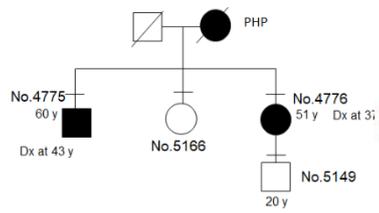


図 11. もう一つの家族性 PHP-Ib 症例の家系図



図 12. GNAS 領域のゲノム構造の不連続性

そして、その後のゲノムシーケンスで、1,091 bp の SVA 型レトロトランスポゾン挿入が同定された。SVA 型レトロトランスポゾンの挿入が複数の疾患発症の原因となっていること、*A/B*-DMR 単独エピ変異がマウスでは *Nesp55* 欠損で生じていることから、*NESP55* 発現が exonization により低下し、これが疾患原因となっている可能性を検討した (図 13)。しかし、リンパ球セルラインや皮膚線維芽細胞における *NESP55* 発現が微弱であるために、この検討はできなかった。

そこで、dCas9-VP64 による転写活性化法を用いて exonization を検討した (図 14)。しかし、exonization を示す所見は得られず、SVA 型レトロトランスポゾンの挿入は、exonization とは別の機序で疾患発症を招いているという結論に至った。

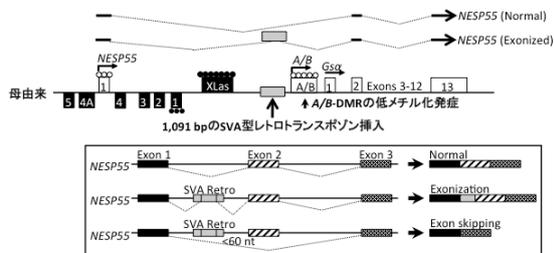


図 13. 家系 4 の患者における SVA 型レトロトランスポゾンの挿入部位と、その結果生じる exonization と exon skipping を示す模式図。Exon skipping は、次のエクソンとの距離が概ね 60 nt 以下のときに生じる。

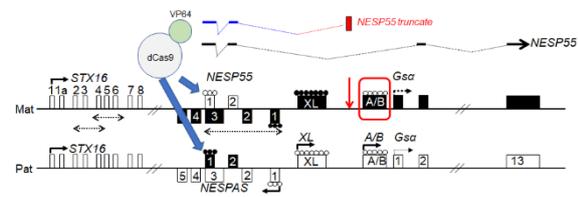
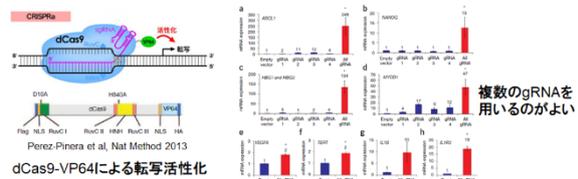


図 14. dCas9-VP64 による転写活性化法。

③まとめ

PHP-Ib の発症機序として、GNAS 領域のゲノム構造や SVA 型レトロトランスポゾン挿入が示唆される。疾患発症機序は未同定であるが、今回のデータは、PHP-Ib 発症機序の遺伝的異質性を明らかとし、今後のエピ変異発症機序の解明に貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukami M*, Suzuki E, Igarashi M, Miyado M, Ogata T	4. 巻 88
2. 論文標題 Gain-of-Function Mutations in G-protein Coupled Receptor Genes Associated with Human Endocrine Disorders.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Endocrinol	6. 最初と最後の頁 351-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cen.13496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyado M, Fukami M, Takada S, Terao M, Nakabayashi K, Hata K, Matsubara Y, Tanaka Y, Sasaki G, Nagasaki K, Shiina M, Ogata K, Masunaga Y, Saitzu H, Ogata T*	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Germline-derived gain-of-function variants of Gsa-coding GNAS gene identified in nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2018121268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki E, Bo R, Sue K, Awano H, Ogata T, Narumi S, Kagami M, Sano S, Fukami M*	4. 巻 153
2. 論文標題 De Novo 50-bp GNAS (Gs-alpha) Intragenic Duplication in a Patient with Pseudohypoparathyroidism Type 1a.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytogenet Genome Res	6. 最初と最後の頁 125-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000485644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sano Shinichiro, Nakamura Akie, Matsubara Keiko, Nagasaki Keisuke, Fukami Maki, Kagami Masayo, Ogata Tsutomu	4. 巻 2
2. 論文標題 (Epi)genotype-Phenotype Analysis in 69 Japanese Patients With Pseudohypoparathyroidism Type I	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Endocr Soc	6. 最初と最後の頁 9~23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/js.2017-00293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐野 伸一郎、中村 明枝、松原 圭子、長崎 啓介、深見 真紀、緒方 勤、鏡 雅代
2. 発表標題 偽性副甲状腺機能低下症の (epi) genotype-phenotype correlation
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐野 伸一郎、中村 明枝、松原 圭子、加藤 芙弥子、深見 真紀、鏡 雅代、緒方 勤
2. 発表標題 PHP-I型の69例における (エピ) 遺伝子型 - 表現型解析
3. 学会等名 第51回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐野伸一郎, 中村 明枝, 松原 圭子, 加藤 芙弥子, 深見 真紀, 鏡 雅代, 緒方 勤
2. 発表標題 PHP-I 型の 69 例における (エピ) 遺伝子型 - 表現型解析
3. 学会等名 第40回日本小児遺伝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyado M, Fukami M, Matsubara Y, Tanaka Y, Sasaki G, Nagasaki K, Masunaga Y, Saitsu H and Ogata T
2. 発表標題 Germline-derived gain-of-function variants of Gs α -coding GNAS gene identified in nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: the first report
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮戸真美, 深見真紀, 緒方勤
2. 発表標題 世界初の生殖細胞由来GNAS機能亢進型バリエーションの同定
3. 学会等名 第30回バゾプレシン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukami M, Miyado M, Takada S, Sasaki G, K Nagasaki, Masunaga M, Saitsu H, Ogata T
2. 発表標題 Germline-derived Gain-of-Function Variants of Gs α -coding GNAS Gene Identified in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis: The First report
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of European Pediatric Endocrinology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	深見 真紀 (Fukami Maki) (40265872)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・部長 (82612)	